

---

## 高田充歯科基礎医学奨励賞受賞講演

---

### 家族性副甲状腺機能亢進症として診断された家系における *HRPT2* 遺伝子の解析

水澤 典子

キーワード：*HRPT2* 遺伝子, Familial isolated hyperparathyroidism (FIHP),  
hyperparathyroidism-jaw tumor (HPT-JT) syndrome

### Genetic Analyses of *HRPT2* Gene in Patients with Familial Isolated Hyperparathyroidism and Hyperparathyroidism-Jaw Tumor Syndrome

Noriko MIZUSAWA

**Abstract:** Familial isolated hyperparathyroidism (FIHP) has an estimated frequency of approximately 1% among all cases of primary hyperparathyroidism. FIHP is an autosomal dominant disorder that can result from incomplete expression of a syndromic form of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1), multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2), familial hypocalciuric hypercalcaemia (FHH), hyperparathyroidism-jaw tumor (HPT-JT) syndrome or from still unrecognized causes.

HPT-JT is predisposed to parathyroid tumors, fibro-osseous lesions of the mandible and maxilla, and renal cysts. Interestingly, it is associated with a high incidence of parathyroid carcinoma in contrast to sporadic and other familial forms of primary hyperparathyroidism. The gene whose inactivation is directly associated with the pathogenesis of HPT-JT syndrome has been identified as the tumor suppressor gene *HRPT2*. In addition, somatic mutations of *HRPT2* have been frequently found in patients with sporadic parathyroid carcinoma.

We investigated the involvement of the *HRPT2*, *MEN1* and calcium sensing receptor (*CASR*) genes in 10 provisional FIHP families and two HPT-JT families. Germline mutations of *HRPT2* were found in two of the 10 FIHP families and one of the two HPT-JT families. One FIHP family with parathyroid carcinoma and atypical adenomas and another FIHP family with cystic parathyroid adenoma had novel frameshift mutations of c.518-521del and c.62-66del, respectively. In a patient with HPT-JT, a *de novo* germline mutation of c.39delC was detected. Novel somatic *HRPT2* mutations of c.70-73del and c.95-102del were found in two of five parathyroid tumors in a family with a c.518-521del mutation. Biallelic inactivation of *HRPT2* by a combination of germline and somatic mutation was confirmed in the parathyroid tumors. The finding that two families diagnosed with FIHP carried *HRPT2* mutations suggests that they have occult HPT-JT.

In conclusion, genetic analysis is important for diagnosing HPT-JT.

## 緒 言

副甲状腺機能亢進症は副甲状腺が腫瘍や過形成により腫大し、副甲状腺ホルモンが過剰分泌する疾患である。多くの副甲状腺機能亢進症は散発性に起こるが、一部は遺伝性で、家族性副甲状腺機能亢進症 (Familial isolated hyperparathyroidism, FIHP) の他に、多発性内分泌腫瘍症 1 型 (MEN1)、多発性内分泌腫瘍症 2A 型 (MEN2A)、家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症 (FHH)、副甲状腺機能亢進症-顎腫瘍症候群 (HPT-JT) で認められる。MEN1 型および 2A 型の原因遺伝子はそれぞれ *MEN1* および *RET*<sup>1)</sup> であり、FHH の多くは calcium-sensing receptor (*CASR*) 遺伝子の変異が原因となっている<sup>2)</sup>。

HPT-JT は副甲状腺腫瘍と顎腫瘍の組み合わせで腫瘍性病変を生じる疾患であり、常染色体優性の遺伝形式をとる。副甲状腺機能亢進症での腫瘍の多くは良性であるのに対し、HPT-JT では癌の割合が高く、副甲状腺腫瘍のうち約 15% に副甲状腺癌を合併する<sup>3)</sup>。また、30% の患者の上顎あるいは下顎に骨形成性あるいはセメント質骨形成性線維腫を合併する。その他に、腎嚢胞 (10%) やウィルムス腫瘍、子宮の腫瘍を伴う<sup>4)</sup>。HPT-JT の家系では、1q25-q31 に位置する *HRPT2* 遺伝子の変異が約半数認められることから、*HRPT2* がこの疾患の原因遺伝子であると考えられている<sup>4-10)</sup>。

我々は、臨床的に FIHP と診断された 10 家系と HPT-JT と診断された 2 家系について *HRPT2* の遺伝子解析を行った。

## 対象と方法

### 対象

臨床的に FIHP と診断された日本人 10 家系と HPT-JT の 2 家系を対象とした<sup>11)</sup>。いずれも MEN1 は否定されている。末梢血および腫瘍は、十分なインフォームドコンセントのもとに採取された。

### ゲノム DNA の抽出と全エクソンの塩基配列決定

血液に等量の 0.2% NaCl を加えて転倒混和し、3,000 rpm, 室温, 15 分の遠心操作を 2 回行って白血球を回収した。白血球および腫瘍組織は、細胞溶解液と proteinase K を加えて一晚孵置した。等量のフェノール-クロロホルムを加え、3,000 rpm, 室温, 5 分遠心操作を 2 回行って上清中のゲノム DNA を回収し、エタノール沈殿をして高分子ゲノムを抽出し、乾燥させた後 TE 50-500  $\mu$ l に溶解し PCR の鋳型とした。PCR は *HRPT2* 遺伝子全 17 エクソンについて行った (表)。

### RNA の抽出と RT-PCR

副甲状腺腫瘍組織から isogen (Wako, 大阪) を用いて RNA を抽出し、iScript II (BioRad laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて cDNA を合成し、*HRPT2* のエクソン 1 から 7 までを含む領域の 953 bp について増幅し、pCR4 Blunt TOPO ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に組み込み、塩基配列を決定した。

表 PCR に用いたプライマー

Exons	Forward Primer Sequence (5'-3')	Reverse Primer Sequence (5'-3')	Size(bp)
EX1	AAGAGGGCGAGGCGACAAGA	AAAGTGCAACTTCTGCTCTAG	373
EX2	GAATCCAGCCTGAAGAGTTG	CAAGGCCAGACCCTGTCTC	247
EX3	TTAAGTTGTGTATCATTGTTATTC	CAATGTCTGTTTAAGACTGGG	168
EX4-5	AAAAAACCTAAAGCATTTCACCTTG	CTAAAGAATCCCAATTTCAATAAC	346
EX6	AAGGAAAAGTTACATGTAGCG	GTAAATGTAAATGTGGAGAGC	265
EX7	TGATACACTCCAGGAATGCC	CTCTCTCACTCCAATGAATGA	310
EX8	GTAGTAGGGAAGAATCGATAG	TCTTCAACGTTACTACTACTGC	278
EX9	GTGAGCCATGGTCATGCTAC	ATTACTTTGCCAACCCCTTACC	267
EX10	CATAGTAGATTCAAGGCTTTG	ACTTCAACATGTGCTACTCAC	262
EX11	AACAGAACAGAGACAGAGAG	CTAAAAAAGTGCCTGTTACG	225
EX12	ACAGTGTGAGAAGATAGTTG	ATAATCAGTGTGGCTTGGGC	336
EX13	GTTTGTGCTTGGTATCCATTC	AGGCCTATAGCACAGAAACC	407
EX14	CTTCCCATTTTCATCACGTGG	TCTTGGGTTCAACACCTGTG	269
EX15	TATGGGACTGTTGCCTAAGG	CATACACATCATATGCGCAG	297
EX16	AATACGGCTTCAGTTGGTGG	GGAATAAGACTGACAACCTC	327
EX17	ATGTCAACTTGTGTTTATACATGC	CTTGTTTGGATGTTCCAG	551

### 塩基配列決定法

サブクローニングしたプラスミドを鋳型として Big Dye Terminator Ver.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて塩基配列の決定を行った。PCR 産物を直接鋳型とする場合は ExoSAP-IT (GE Healthcare, UK) で処理を行った。検出には PRISM3100 (Applied Biosystems) を使用した。

### マイクロサテライト解析によるヘテロ接合性の消失 (LOH) の解析

*HRPT2* 遺伝子イントロン10領域の F プライマー 5'-TGATTCTCATGCATTTCCTG-3' および R プライマー 5'-TAACTACCTGAAACCCATCAC-3', イントロン14領域の F プライマー 5'-AATTAGTGTCACAGTATCTTA-3' および R プライマー 5'-CTCAAAGTATCTATTAGGTA-3' をそれぞれ蛍光標識プライマーとして合成し、増幅産物の解析には PRISM3700, GeneScan (Applied Biosystems) を使用した。

### メチル化 CpG アイランドの検出

メチル化 CpG アイランドの検出には、腫瘍から抽出したゲノム DNA を BisulFast Methylated DNA Detection kit (東洋紡, 大阪) を用いて処理した後、メチル化の有無にかかわらず増幅可能なプライマーペア (MF プライマー 5'-TGTTGGGGATGGAAGTGTGATTATT-3' および MR プライマー 5'-ACAATCTCCTTCTTCTAAATATTATACTAT-3') によって増幅された 564 bp の断片を pCR4 Blunt TOPO ベクターを用いてサブクローニングし、塩基配列の決定により 65 カ所の CpG アイランドについてメチル化の有無を検討した。

## 結 果

### 1) FIHP の10家系のうち、2家系に *HRPT2* の変異が認められた。

ゲノム DNA の *HRPT2* 遺伝子全17エクソンの解析により、臨床的に FIHP と診断された10家系のうち2家系に *HRPT2* 遺伝子の変異が認められた。家系 A において、*HRPT2* 遺伝子のヘテロ接合性の c.518-521del 変異は、家系員すでに FIHP と診断されていた4人 (II-3, II-4, II-5, III-3) と、血清カルシウム濃度および PTH 濃度が正常な健常人である母親 (I-2) の白血球ゲノム DNA で認められ、A 家系における *HRPT2* 遺伝子の胚細胞変異であることが確認された (図1 A)。この変異は、FIHP と診断されていない家系員 II-6 や健常人50人においては検出されなかった。また、FIHP 患者4名から採取した5個の副甲状腺腫瘍における RNA 配列の解析により、II-3 (腺腫)、II-4 (異型腺腫および腺腫)、II-5 (異型腺腫)、III-3 (異型腺腫) のうち、II-4 副甲状腺腫での c.70-73del および、II-5 副甲状腺異型腺腫での c.95-102del の2種の体細胞変異を認めた。いずれも塩基配列の変化

によるフレームシフトで、早期に停止コドンが出現した (図1 Bおよび C)。この体細胞変異は胚細胞変異が存在する対立遺伝子 (アレル) とは別のアレルに存在することが確認された。イントロン10と14でのマイクロサテライトマーカーを用いた LOH の検討では、いずれの腫瘍においても LOH の可能性を示す結果は認められなかった。また、*HRPT2* 遺伝子プロモーターにおける CpG アイランドの高メチル化は認められなかった。

家系 B では、家系員 III-1 に c.62-66del の胚細胞変異が認められ、これまで報告されていない変異であった。エクソン1内に相当する塩基配列の変化によるフレームシフトで、エクソン2内に早期に停止コドンが出現した (データ掲載なし)。

### 2) HPT-JT の2家系のうち、1家系に *HRPT2* 遺伝子の変異が認められた。

ゲノム DNA の *HRPT2* 遺伝子解析により、HPT-JT の2家系のうち F 家系において、家系員 II-1 に c.39del C の胚細胞変異を検出した (図2 B)。家系内でのハプロタイプ解析の結果 (図2 A)、イントロン2内の一塩基多型 (SNP), IVS2+28T/C/del4 を示す多型およびマイクロサテライトマーカーによって、いずれもメンデルの法則に従った遺伝形式が確認されたが、両親ともに c.39del C の変異が認められなかった。翻訳開始点より-10の G に SNP が存在するのを見いだした。*HRPT2* 遺伝子近傍のハプロタイプを解析した結果、家系内の父親由来の T のアレルが発端者である II-1 に認められ、このアレルに c.39del C の変異が認められた。すなわち、家系員 II-1 に認められた c.39del C の胚細胞変異は、父親の精子形成時に起こった *de novo* 変異であることが明らかになった。

## 考 察

顎腫瘍が認められないため、臨床的に「家族性副甲状腺機能亢進症 (FIHP)」と診断されていた10家系のうち2家系 (A 家系および B 家系) について *HRPT2* 遺伝子の胚細胞変異が確認されたため、HPT-JT であると確定診断された。

A 家系では、健常人も含めた5名から *HRPT2* 遺伝子の方のアレルの c.518-521del 胚細胞変異が認められ、そのうち4名の5個の腫瘍について、*HRPT2* 遺伝子解析を行った結果、2個の腫瘍から c.70-73del および c.95-102del の体細胞変異を確認した。これらの体細胞変異は、サブクローニングして塩基配列の解析を行うことで、胚細胞変異が存在する c.518-521del アレルとは別のアレルに存在していることを確認した。また、I-2 は遺伝子変異保有者であるが、無症候である。今後、本疾患の浸透率を明らかにする必要がある。

*HRPT2* 遺伝子はがん抑制遺伝子の一つで、両方のアレルにそれぞれ変異や欠失あるいはプロモーター領域における CpG アイランドの高度なメチル化による転写

抑制などの機序により遺伝子の不活化が生じ、腫瘍化の原因になると考えられる<sup>12)</sup>。しかし、HPT-JTの副甲状腺腫瘍での *HRPT2* 遺伝子の LOH は、*MEN1* における *MEN1* 遺伝子の LOH に比べて頻度は低いと報告されている<sup>13,14)</sup>。A 家系においても、1q25-q31 を含む領域の LOH は認められなかった。また、*HRPT2* 遺伝子プロモーター領域における CpG アイランドのメチル化の程度を検討したが、高度なメチル化は認められなかった。*HRPT2* 遺伝子の不活化には *HRPT2* 遺伝子の欠失、プロモーター内のメチル化以外の他の要因が関係している可能性もあり、今後の検討が必要であると考えられた。

HPT-JT と診断されていた 2 家系のうち 1 家系 (F 家系) において、発端者の *HRPT2* 遺伝子の一方のアレル

に c.39delC の胚細胞変異を検出した。F 家系では発端者の妹が 1 歳時にウィルムス腫瘍の手術を受けているため、*HRPT2* 遺伝子の変異を有する可能性が高いと考えられた。しかしながら、血清 PTH および血中カルシウム値は正常で、*HRPT2* 遺伝子の変異は認められなかった。HPT-JT はしばしばウィルムス腫瘍を伴うが<sup>15,16)</sup>、本家系のウィルムス腫瘍は HPT-JT に伴うものではないと考えられた。発端者にのみ認められた胚細胞変異は近傍の SNP を指標とすることで父親由来の *de novo* 変異であることが確認された。このような *de novo* 変異は多発性内分泌腫瘍 2B 型における原因遺伝子の *RET* 遺伝子では一般的な現象であるが<sup>17)</sup>、*HRPT2* 遺伝子の報告は少ない<sup>18)</sup>。

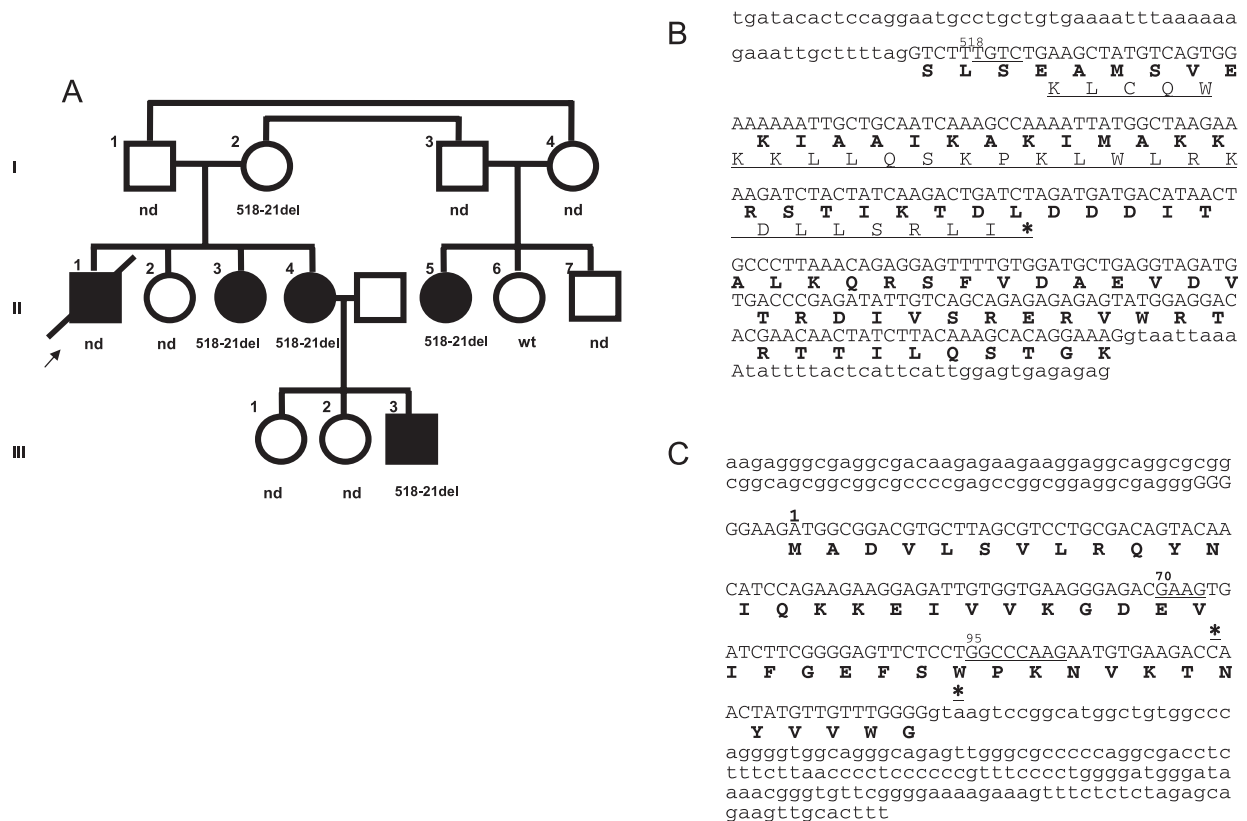


図1 家系Aにおける胚細胞変異と体細胞変異

A. 家系図。世代はローマ数字で、各個人をアラビア数字で示す。発端者は矢印で示す。男性は四角、女性は丸で示す。斜線は死亡していることを示す。既に副甲状腺機能亢進症と診断されている個人は黒塗りで示す。*HRPT2* 遺伝子解析の結果について、野生型の配列だった場合、変異があった場合、未検定の場合をそれぞれ wt, mut, nd で示す。

B. 胚細胞変異の配列。*HRPT2* 遺伝子エクソン 7 付近の塩基配列を示す。変異部分は下線で示し、上段に野生型のアミノ酸配列を示す。小文字はイントロンの配列を示す。下段に c.518-521del 変異の塩基配列に従ったアミノ酸配列を下線で示す。フレームシフトにより、早期停止コドンの出現が認められる。

C. 体細胞変異の配列。*HRPT2* 遺伝子エクソン 1 付近の塩基配列を示す。変異部分は下線で示し、上段に野生型のアミノ酸配列を示す。小文字はイントロンの配列を示す。下段に II-3 腺腫における c.95-102del 変異および II-5 異型腺腫における c.70-73del 変異の塩基配列に従ったアミノ酸配列を示す。フレームシフトにより、いずれも直後に停止コドンの出現が認められる。



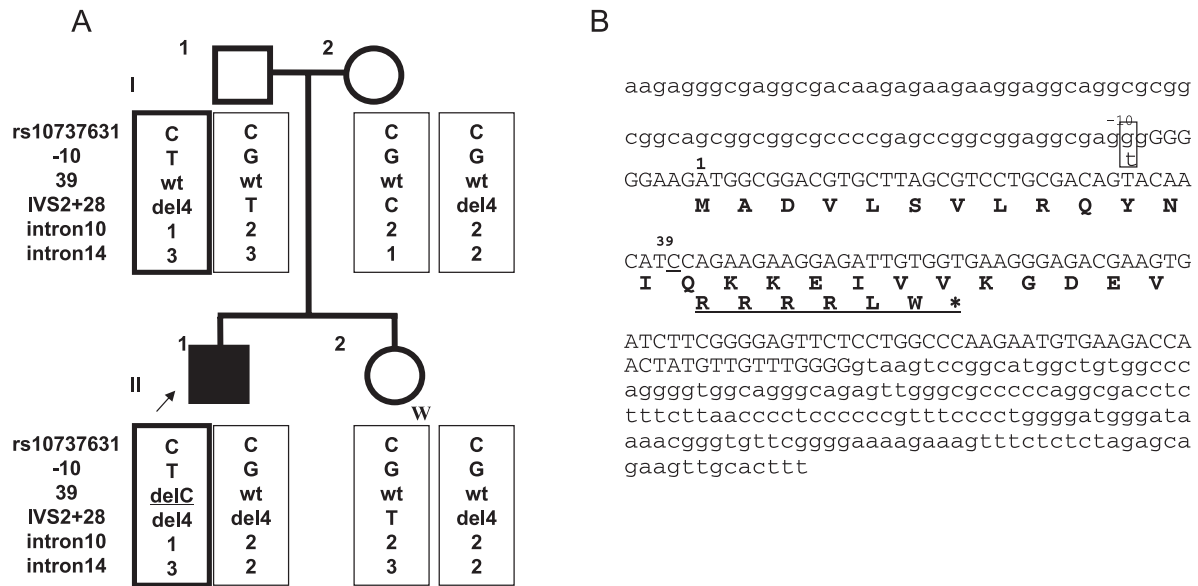


図2 A. 家系Fにおける胚細胞変異 (de novo 変異) 家系図。

家系図における記号は図1と同一である。ウィルムス腫瘍が認められた個人はWで示す。ハプロタイプ解析により、発端者において発見された胚細胞変異 c.39delC (下線部) が父親由来の de novo 変異であることを示す。

B. 胚細胞変異の配列。*HRPT2* 遺伝子エクソン1付近の塩基配列を示す。変異部分は下線で示し、上段に野生型のアミノ酸配列を示す。小文字はイントロンの配列を示す。下段に c.39delC 変異の塩基配列に従ったアミノ酸配列を示す。フレームシフトにより、早期停止コドンの出現が認められる。翻訳開始点より上流-10の SNP (G/T) 部は枠で囲んでいる。

我々は、*HRPT2* の遺伝子解析を行うことにより、顎腫瘍が認められないために FIHP と診断された10家系について、HPT-JT 家系として確定診断された2家系を明らかにした。また、家系員の *HRPT2* 遺伝子解析を行うことにより、将来的に顎腫瘍が発生する危険性を示唆することができた。*HRPT2* 遺伝子の不活化を検討する上で *HRPT2* の遺伝子上流調節領域の遺伝子変異やメチル化状態の解析や *HRPT2* 遺伝子の欠損の有無についての報告は本研究がはじめてである。

HPT-JT は稀な遺伝性疾患で、内分泌領域と歯科領域にまたがる疾患であることから、しばしば的確な診断が行われていない。遺伝子診断を行うことにより、本疾患のより安全な予防や治療に活かされることが期待される。

## 参考文献

- 1) Marx SJ: Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer* 5, 367-375 (2005)
- 2) Brown EM and MacLeod RJ: Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 81, 239-297 (2001)
- 3) Simonds WF, James-Newton LA, Agarwal SK, Yang B, Skarulis MC, Hendy GN and Marx SJ: Familial isolated hyperparathyroidism: clinical and genetic characteristics of 36 kindreds. *Medicine* 81, 1-26 (2002)
- 4) Bradley KJ, Hobbs MR, Buley ID, Carpten JD, Cavaco BM, Fares JE, Laidler P, Manek S, Robbins CM, Salti IS, Thompson NW, Jackson CE and Thakker RV: Uterine tumours are a phenotypic manifestation of the hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. *J Intern Med* 257, 18-26 (2005)
- 5) Carpten JD, Robbins CM, Villablanca A, Forsberg L, Presciuttini S, Bailey-Wilson J, Simonds WF, Gillanders EM, Kennedy AM, Chen JD, Agarwal SK, Sood R, Jones MP, Moses TY, Haven C, Petillo D, Leotlela PD, Harding B, Cameron D, Pannett AA, Hoog A, Heath H III, James-Newton LA, Robinson B, Zarbo RJ, Cavaco BM, Wassif W, Perrier ND, Rosen IB, Kristoffersson U, Turnpenny PD, Farnebo LO, Besser GM, Jackson CE, Morreau H, Trent JM, Thakker RV, Marx SJ, The BT, Larsson C and Hobbs MR: *HRPT2*, encoding parafibromin, is mutated in hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *Nat Genet* 32, 676-680 (2002)

- 6) Howell VM, Haven CJ, Kahnoski K, Khoo SK, Petillo D, Chen J, Fleuren GJ, Robinson BG, Delbridge LW, Philips J, Nelson AE, Krause U, Hammje K, Dralle H, Hoang-Vu C, Gimm O, Marsh DJ, Morreau H and The BT: HRPT2 mutations are associated with malignancy in sporadic parathyroid tumours. *J Med Genet* 40, 657-663 (2003)
- 7) Cavaco BM, Guerra L, Bradley KJ, Carvalho D, Harding B, Oliveira A, Santos MA, Sobrinho LG, Thakker RV and Leite V: Hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome in Roma families from Portugal is due to a founder mutation of the HRPT2 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 1747-1752 (2004)
- 8) Cetani F, Pardi E, Borsari S, Viacava P, Dipollina G, Cianferotti L, Ambrogini E, Gazzero E, Colussi G, Berti P, Miccoli P, Pinchera A and Marcocci C: Genetic analyses of the HRPT2 gene in primary hyperparathyroidism: germline and somatic mutations in familial and sporadic parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 5583-5591 (2004)
- 9) Bradley KJ, Cavaco BM, Bowl MR, Harding B, Young A and Thakker RV: Utilisation of a cryptic non-canonical donor splice site of the gene encoding PARAFIBROMIN is associated with familial isolated primary hyperparathyroidism. *J Med Genet* 42, e51 (2005)
- 10) Moon SD, Park JH, Kim EM, Kim JH, Han JH, Yoo SJ, Yoon KH, Kang MI, Lee KW, Son HY, Kang SK, Oh SJ, Kim KM, Yoon SJ, Park JG, Kim IJ, Kang HC, Hong SW, Kim KR and Cha BY: A novel IVS2-1G>A mutation causes aberrant splicing of the HRPT2 gene in a family with hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 878-883 (2005)
- 11) Mizusawa N, Uchino S, Iwata T, Tsuyuguchi M, Suzuki Y, Mizukoshi T, Yamashita Y, Sakurai A, Suzuki S, Beniko M, Tahara H, Fujisawa M, Kamata N, Fujisawa K, Yashiro T, Nagao D, Golam MH, Sano T, Noguchi S, Yoshimoto K: Genetic analyses in patients with familial isolated hyperparathyroidism and hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. *Clin Endocrinol* 65, 9-16 (2006)
- 12) Herman JG and Baylin SB: Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 349, 2042-2054 (2003)
- 13) Yoshimoto K: Multiple endocrine neoplasia type 1: from bedside to benchside. *J Med Invest* 47, 108-117 (2000)
- 14) Agarwal SK, Burns AL, Sukhodolets KE, Kennedy PA, Obungu VH, Hickman AB, Mullendore ME, Whitten I, Skarulis MC, Simonds WF, Mateo C, Crabtree JS, Scacheri PC, Ji Y, Novotny EA, Garrett-Beal L, Ward JM, Libutti SK, Alexander HR, Cerrato A, Parisi MJ, Anna ASS, Oliver B, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM and Marx SJ: Molecular pathology of the MEN1 gene. *Ann NY Acad Sci* 1014, 189-198 (2004)
- 15) Kakinuma A, Morimoto I, Nakano Y, Fujimoto R, Ishida O, Okada Y, Inokuchi N, Fujihira T and Eto S: Familial primary hyperparathyroidism complicated with Wilms' tumor. *Intern Med* 33, 123-126 (1994)
- 16) Szabo J, Heath B, Hill VM, Jackson CE, Zarbo RJ, Mallette LE, Chew SL, Besser GM, Thakker RV, Huff V, Leppert MF and Heath H III: Hereditary hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome: the endocrine tumor gene HRPT2 maps to chromosome 1q21-q31. *Am J Hum Genet* 56, 944-950 (1995)
- 17) Carlson KM, Bracamontes J, Jackson CE, Clark R, Lacroix A, Wells SA Jr and Goodfellow PJ: Parent-of-origin effects in multiple endocrine neoplasia type 2B. *Am J Hum Genet* 55, 1076-1082 (1994)
- 18) Villablanca A, Calender A, Forsberg L, Hoog A, Cheng JD, Petillo D, Bauters C, Kahnoski K, Ebeling T, Salmela P, Richardson AL, Delbridge L, Meyrier A, Proye C, Carpten JD, The BT, Robinson BG and Larsson C: Germline and de novo mutations in the HRPT2 tumour suppressor gene in familial isolated hyperparathyroidism (FIHP). *J Med Genet* 41, e32 (2004)